



TITLE:

腎細胞癌における核DNA量,
AgNOR数, PCNA, c-erbB-2の予後予
測因子としての有用性に関する研
究

AUTHOR(S):

玉木, 正義; 前田, 真一; 出口, 隆; 河田, 幸道

CITATION:

玉木, 正義 ...[et al]. 腎細胞癌における核DNA量, AgNOR数, PCNA, c-erbB-2の予後予測因子としての有用性に関する研究. 泌尿器科紀要 1997, 43(10): 697-702

ISSUE DATE:

1997-10

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/116054>

RIGHT:

腎細胞癌における核 DNA 量, AgNOR 数, PCNA, c-erbB-2 の予後予測因子と しての有用性に関する研究

トヨタ記念病院泌尿器科 (部長: 前田真一)

玉木 正義, 前田 真一

岐阜大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 河田幸道教授)

出口 隆, 河田 幸道

USEFULNESS OF DNA PLOIDY, AgNORs, PCNA AND c-erbB-2 AS PREDICTORS OF PROGNOSIS IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

Masayoshi TAMAKI and Shin-ichi MAEDA

From the Department of Urology, Toyota Memorial Hospital

Takashi DEGUCHI and Yukimichi KAWADA

From the Department of Urology, Gifu University School of Medicine

Seventy one patients with renal cell carcinomas were examined for a variety of markers associated with tumor malignancy: nuclear DNA ploidy, AgNORs, PCNA and c-erbB-2. Usefulness of the markers in predicting the prognosis was studied by analyzing the relationship between each of these markers and the prognosis of the patients with renal cell carcinomas. DNA ploidy was analyzed by flow cytometry. AgNORs were stained by the silver colloid method. PCNA and c-erbB-2 were detected by immunohistochemistry. In all the patients examined, DNA ploidy, AgNORs, PCNA and c-erbB-2 were significant predictors of the prognosis. Of the patients with grade 2 carcinomas, the survival rate was significantly higher in the patients with the PCNA-positive cells of lower than 35.0% than in those with the positive cells of more than 35.0%. The patients without the expression of c-erbB-2 exhibited a significantly higher survival rate than those with the expression. In the patients with grade 2 carcinomas, however, neither DNA ploidy nor AgNORs was a significant predictor of the prognosis. These findings suggest that PCNA and c-erbB-2 provide more accurate information than the others to understand the biological characteristics of the grade 2 carcinomas and are useful in predicting the prognosis of the patients with grade 2 renal cell carcinomas.

(Acta Urol. Jpn. 43 : 697-702, 1997)

Key words : Renal cell carcinoma, DNA ploidy, AgNORs, PCNA, c-erbB-2

緒 言

腎細胞癌の組織学的悪性度 (grade) は, 予後予測因子として重要であるとされている¹⁻³⁾ 金丸ら⁴⁾や北村ら⁵⁾は grade 別の 5 年生存率について grade 1 と grade 2 は grade 3 より有意に予後良好であるが, grade 1 と grade 2 との間には差はなかったと報告している. しかし, 金丸ら⁴⁾の grade 1 の 5 年生存率は, 100%で予後良好であるが, grade 2 は 78%であり, 癌の再発進行により癌死する例が認められる. そのため grade 2 においても, 予後良好群と不良群に分けることができれば適切な治療法の選択が可能となり, 腎癌患者の予後の改善に有用と考えられる. 予後を予測するための grade 以外の各種の生物学的悪性

度の指標が, 各種の癌において報告され, それらの有用性が認められている. そこで, 今回, 腎細胞癌患者 71 例において, flow cytometry を用いた多数細胞の核内 DNA の分布パターンである核 DNA 量, 核小体内の RNA polymerase 1 により転写される大きな DNA のループに接し, 銀により染色される非ヒストン蛋白質である argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR)⁶⁾, DNA polymerase- δ の補助蛋白質で, G1 後期から S 期にかけて合成される proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁷⁾, ラット神経芽細胞腫の癌遺伝子 neu に対する protooncogene である c-erbB-2⁸⁾ の 4 者を同時に検索し, これら指標の腎細胞癌の予後予測における有用性を検討し, とくに, grade 2 症例における予後良好群と不良群との識別へ

の可能性を検討した。

対象と方法

対象症例：1990年4月から1994年6月までにトヨタ記念病院泌尿器科、岐阜大学医学部泌尿器科およびその関連病院にて手術が施行された腎細胞癌71例を検討対象とした。患者の性別は男性52例、女性19例、年齢構成は、20歳から80歳（平均59.3歳）であった。病理組織学的異型度は grade 1, 18例, grade 2, 44例, grade 3, 9例であった。病理組織学的進展度は、pT1, 9例, pT2, 45例, pT3, 17例であった。71例中核 DNA 量は71例, AgNOR は61例, PCNA は54例, c-erbB-2 は63例に施行した。それぞれの grade と stage は Table 1 のごとくであり各群の grade と stage の分布には差を認めなかった。組織学的構築型は alveolar type, 55例, tubular type, 5例, papillary type, 4例, cystic type, 5例, solid type, 1例, mixed type, 1例であった。組織学的細胞型は clear cell subtype, 55例, granular cell subtype, 5例, mixed subtype, 10例, pleomorphic cell type 1例であった。摘出腎は一部を核 DNA 量測定用として使用し、残りを10%ホルマリン液にて約12時間から24時間固定後、パラフィン包埋ブロックを作成し3μmの薄切切片を AgNOR 染色, PCNA 染色および c-erbB-2 染色に使用した。組織学的分類は腎細胞癌取り扱い規約⁹⁾に従った。なお, grade が2つ以上混在している場合は最も高い grade を採用した。

核 DNA 量の分析：核 DNA 量は腫瘍組織を細切後、Vindeløv らの low-salt rapid detergent method¹⁰⁾ に準じて処理し、flow cytometer にて測定した。DNA 染色には propidium iodide を用い、flow cytometer は FACS440 (Becton Dickinson 社) を用いた。DNA ploidy の判定については、DNA histogram 上 2c と 4c の 2 peak を示し、4c 細胞の割合が10%未満のものを diploid とした。DNA histogram 上 2c と 4c peak が明らかに異なる位置の peak を示すものと、2 peak を示すが 4c 細胞の割合が10%以上のものを aneuploid とした。

AgNOR 染色：AgNOR 染色は、切片を脱パラフィン化した後、Platon らの one-step silver colloid

method⁶⁾ に準じて2%ゼラチン1%蟻酸液と50%硝酸銀液とを1:2に混合して作成した AgNOR 染色液に1時間、室温の暗室で反応させ行った。検体の AgNOR 数は、100核あたりの平均 AgNOR 数とした。

免疫組織学的染色 (PCNA 染色, c-erbB-2 染色)：免疫組織学的染色は、切片を脱パラフィン化した後、0.3% H₂O₂ 加メタノール溶液にて内因性ペルオキシダーゼを阻害し、ブロッキング用血清にて非特異反応を阻止したのち、PCNA の検出のためには PC-10 (DAKO 社), c-erbB-2 の検出のためには NCL-CB11 (Novocastra 社) をそれぞれ一次抗体として使用した。4°C で一晩反応させ洗浄後、Avidin-Biotin-Complex と室温で30分反応させた後、3,3'-diaminobenzidine, tetra-hydrochloride (DAB 基質液) にて発色させた。PCNA は核が染色された腫瘍細胞を陽性細胞とし、陽性細胞が集中している部分を選んで1,000個の腫瘍細胞中の陽性細胞の割合を測定した。また、c-erbB-2 は細胞質が染色された腫瘍細胞を陽性細胞とし、陽性細胞が少数でも認められた症例は陽性とした。

統計学的分析：生存率の算出に際しては癌死例 (cause-specific case) のみを死亡として取り扱い、Kaplan-Meier 法を用いて、統計学的比較には Logrank 法を用いた。5%の危険率をもって有意差とした。

結 果

I 各指標と予後との関連

今回検討した71症例の grade, stage と死亡数を示す (Table 2)。grade と予後との関連 (Fig. 1A) では、grade が高くなるに従って、予後不良となる傾向を認めた。grade 1 症例と grade 3 症例, grade 2 症例と grade 3 症例の間に生存率に統計学的有意差を認めた ($p < 0.05$)。しかし、grade 1 症例と grade 2 症例の間には統計学的有意差を認めなかった。

T 因子と予後との関連では、pT1 症例と pT3 症例, pT2 症例と pT3 症例の間に生存率に統計学的有意差を認めた ($p < 0.05$)。しかし、pT1 症例と pT2 症例の間には統計学的有意差を認めなかった。pT1+ pT2 症例と pT3 症例の生存率の間には統計学的有意差を認めた ($p < 0.05$) (Fig. 1B)。

Ploidy と予後との関連では、aneuploid 症例が統計学的に有意に diploid 症例より予後不良であった ($p < 0.05$) (Fig. 2)。なお、diploid 症例は43例、aneuploid 症例は28例であった。

AgNOR 数と予後との関連では、receiver operating characteristic (ROC) 曲線より算出した AgNOR 数1.90 を境界として2群に分けると、AgNOR 数

Table 1. Histological grade and stage of renal cell carcinoma examined for ploidy, AgNORs, PCNA and c-erbB-2

	G1 : G2 : G3	pT1 : pT2 : pT3
Ploidy	18 : 44 : 9	9 : 45 : 17
AgNORs	15 : 37 : 9	6 : 41 : 14
PCNA	14 : 32 : 8	5 : 34 : 15
c-erbB-2	16 : 38 : 9	6 : 41 : 16

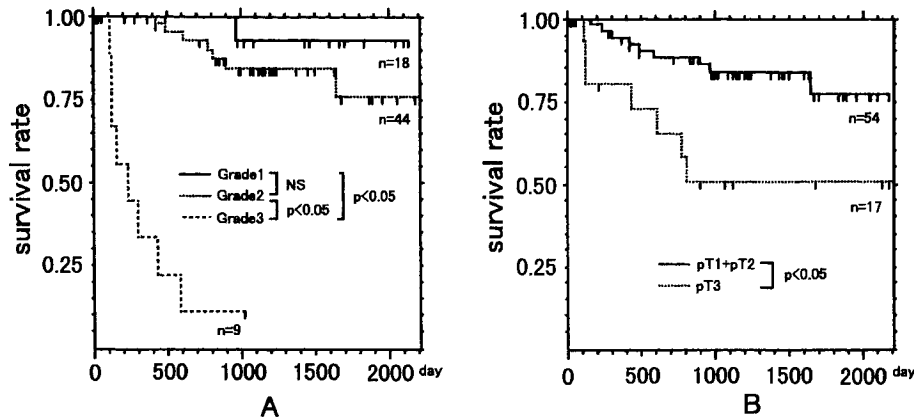


Fig. 1. Survival rate according to grade (A), and stage (B) in the patients with renal cell carcinomas.

Table 2. Outcome of the patients with renal cell carcinoma

		pT1	pT2	pT3	計
Grade 1	alive	2	14	1	17
	dead	0	1	0	1
Grade 2	alive	7	21	9	37
	dead	0	4	3	7
Grade 3	alive	0	1	0	1
	dead	0	4	4	8

1.90以上の症例は, 1.90未満の症例より統計学的に有意に予後不良であった ($p<0.05$) (Fig. 3). なお, AgNOR 数1.90未満の症例は33例, 1.90以上の症例は28例であった.

PCNA 陽性率と予後との関連では, ROC 曲線より算出した PCNA 陽性率35.0%を境界として2群に分けると, PCNA 35.0%以上の症例は, 35.0%未満の症例より統計学的に有意に予後不良であった ($p<0.05$) (Fig. 4). なお, PCNA 35.0%未満の症例は33例, 35.0%以上の症例は21例であった.

c-erbB-2 と予後との関連では, c-erbB-2 陽性の症例は, c-erbB-2 陰性の症例より統計学的に有意に予後不良であった ($p<0.05$) (Fig. 5). なお, c-erbB-2 陰性の症例は32例, 陽性の症例は31例であった.

II grade 2 症例における各指標と予後との関連

ここまでの検討では, grade 3 症例は grade 1, grade 2 症例に比較して明らかに予後不良であり, grade 1 症例と grade 2 症例の間には統計学的有意差を認めなかった. しかし, grade 1 症例は, 18例中1例のみの死亡で生存率92.9%と予後良好であるが, grade 2 症例は, 44例中7例 (生存率76.0%) と癌の再発進行により死亡する症例を認めた. したがって全症例の62.0%をしめる grade 2 症例の中から予後不良群を選び出す指標を見出すことは意義あることと考え, grade 2 症例における予後予測因子としての T 因子, 核 DNA 量, AgNOR, PCNA および c-erbB-2

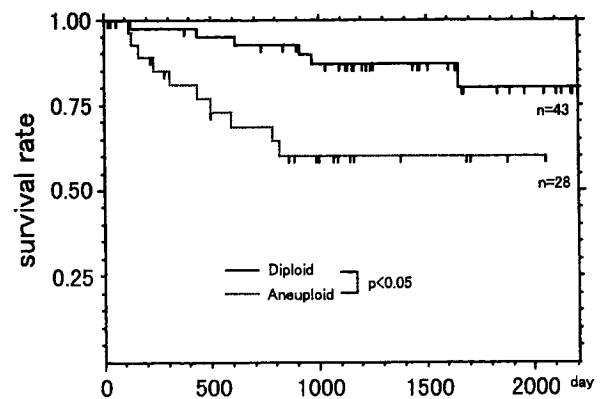


Fig. 2. Survival rate according to ploidy in the patients with renal cell carcinomas.

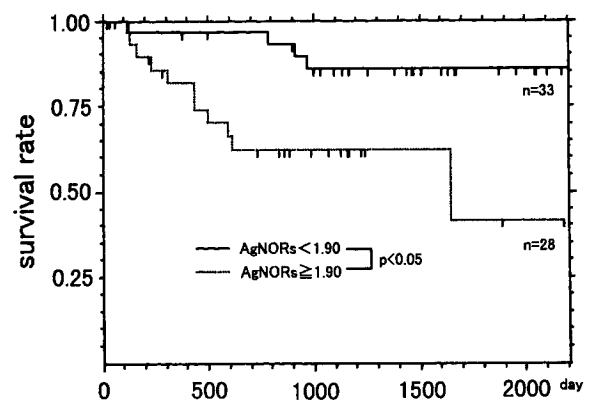


Fig. 3. Survival rate according to AgNORs in the patients with renal cell carcinomas.

の有用性を検討した.

T 因子と予後との関連では, pT1, pT2, pT3 の各 T 因子間の生存率に統計学的有意差を認めなかった. また, pT1+pT2 症例と pT3 症例の間にも生存率に統計学的有意差を認めなかった. なお, pT1 症例は7例, pT2 症例は25例, pT3 症例は12例であった.

ploidy と予後との関連では, aneuploid 症例と di-

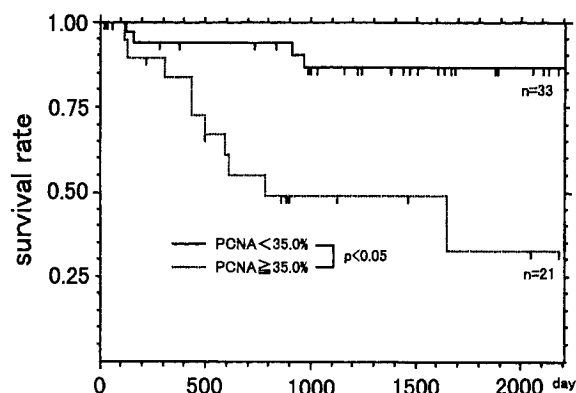


Fig. 4. Survival rate according to PCNA in the patients with renal cell carcinomas.

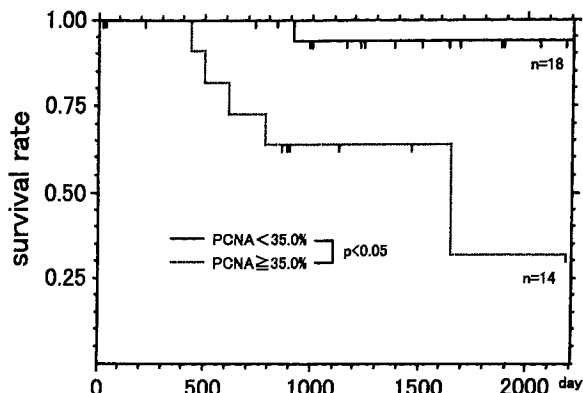


Fig. 6. Survival rate according to PCNA in the patients with grade 2 renal cell carcinoma.

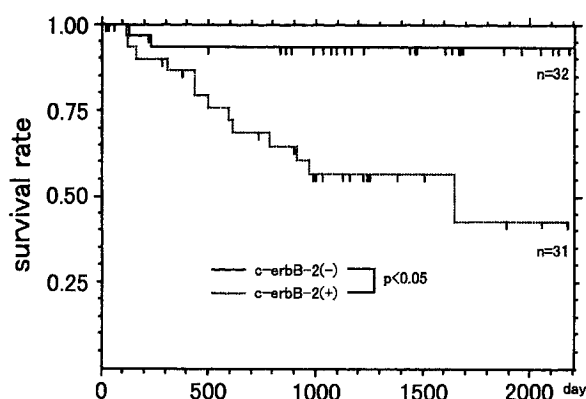


Fig. 5. Survival rate according to c-erbB-2 in the patients with renal cell carcinomas.

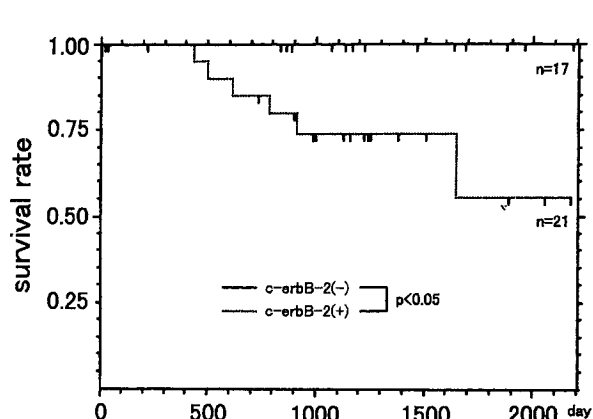


Fig. 7. Survival rate according to c-erbB-2 in the patients with grade 2 renal cell carcinoma.

ploid 症例の間に生存率に統計学的有意差を認めなかった。なお、diploid 症例は26例、aneuploid 症例は18例であった。

AgNOR 数と予後との関連では、AgNOR 数1.90以上の症例と1.90未満の症例の間に生存率に統計学的有意差を認めなかった。なお、AgNOR 数1.90未満の症例は18例、1.90以上の症例は19例であった。

PCNA 陽性率と予後との関連では、PCNA 陽性率35.0%以上の症例は35.0%未満の症例より有意に予後不良であった ($p < 0.05$) (Fig. 6)。なお、PCNA 35.0%未満の症例は18例、35.0%以上の症例は19例であった。また、死亡例6例における PCNA 陽性率が35.0%以上の症例は5例 (83.3%) と、生存例における26例中9例 (34.6%) より有意に高率であった ($p < 0.05$)。

c-erbB-2 と予後との関連では、c-erbB-2 陽性症例は c-erbB-2 陰性症例より有意に予後不良であった ($p < 0.05$) (Fig. 7)。なお、c-erbB-2 陰性の症例は17例、陽性の症例は21例であった。また、死亡例6例における c-erbB-2 陽性の症例は6例 (100%) と、生存例における32例中15例 (46.9%) より有意に高率であった ($p < 0.05$)。

なお、各群間で術後の補助療法に差は認めなかった。

考 察

腎細胞癌は多彩な組織像を呈し、多彩な臨床経過をとる腫瘍である。このため予後を推定し治療を行うについては、組織学的悪性度 (grade) が重要であるとされている¹⁻³⁾。今回の検討でも、grade 3 症例は grade 1, grade 2 症例に比較して明らかに予後不良であり、従来の報告^{4,5)}と同様の結果を示した。さらに grade 1 症例は、18例中1例しか死亡例がなく予後良好であった。しかし、全症例の62.0%をしめる grade 2 症例においては44例中7例と癌の再発進行により死亡する症例を認めた。このため grade 2 症例の中で、予後の良好な症例と不良な症例に分ける指標があれば、予後不良な症例に対して従来以上の積極的治療法を選択することにより予後が改善することが期待される。そこで、今回、grade 2 症例の中から予後不良群を選び出すための指標を見いだす目的で各種の予後因子について検討を行った。

核 DNA は、flow cytometer という特殊な機器を

使用するが、新鮮標本を使用しキットにて簡易に測定可能である。AgNOR は、Platon ら⁶⁾により簡易な染色方法が開発され、特殊な薬品を使用せず通常の標本作製過程より得た標本にて測定可能である。PCNA と c-erbB-2 は臨床病理学的に行われている免疫組織学的染色にて通常の標本作製過程より得た標本にて検出可能であり、これら4者の測定は、いずれも臨床応用可能な簡便な方法である。

今回の検討では、grade 2 症例において、pT1 + pT2 症例と pT3 症例とに2分類した場合のT分類および核 DNA はいずれも、予後の良好群と不良群の異なる2群に分けることはできなかった。中野ら¹¹⁾も grade 2 症例において、1検体で測定した核 DNA 量は有用な予後予測因子でなかったと報告をしている。しかし、永森¹²⁾は腎細胞癌の核 DNA 量において癌細胞の組織学的多様性 (heterogeneity) を考えて、4検体以上の異なる部位をそれぞれ別個に核 DNA 量の測定をしないかぎり、aneuploid 部分が存在する症例を diploid 症例と判定し、予後を正確に予測できないと報告している。今回の検討では、核 DNA 量は体積の比較的大きな1検体として測定した。このことが、今回の検討で核 DNA 量と予後との関連を見出せなかった原因の一つかもしれない。

AgNOR 数も今回の grade 2 症例の検討では、予後予測の指標となりえなかった。阿部ら¹³⁾は grade 1, grade 2 および grade 3 の全症例の検討では AgNOR 数の大小により予後を分けることができるが、grade 3 症例に限った検討では AgNOR は予後予測因子とならず、AgNOR は grade を越える指標ではないと述べている。今回の検討対象は grade 2 症例であるが阿部ら¹³⁾の grade 3 症例における結果と同じく AgNOR は同一 grade 内での予後予測因子にならなかった。

しかしながら今回の検討で、grade 2 症例において PCNA は予後予測因子となることが示された。PCNA は細胞の増殖期である G1 後期から S 期にかけて合成される⁷⁾。このため細胞内の PCNA 量は細胞の増殖能を反映すると考えられている¹⁴⁾。泌尿器科癌においても膀胱癌^{15, 16)}、精巣腫瘍¹⁷⁾で悪性度の指標として有用であると報告されている。腎細胞癌でも、関ら¹⁸⁾はすべての症例を対象にした検討で PCNA 陽性率は今回の検討と同様に予後予測因子となると報告している。また、今回のように grade を同一にした検討では、中野ら¹¹⁾が grade 2 症例において PCNA が有用な予後予測因子であると述べている。従って PCNA は従来の腎細胞癌の病理組織学的な悪性度の指標である grade 分類を補助しうる指標となりうるものと思われる。

さらに、今回の検討では、grade 2 症例において c-

erbB-2 も予後予測因子となることが示された。c-erbB-2 は増殖因子といわれている epidermal growth factor receptor と相同性を示す遺伝子であるため増殖因子レセプターといわれている⁷⁾。乳癌患者では c-erbB-2 遺伝子増殖を認める患者は予後が不良であると報告されている¹⁹⁾。また、Yusa らはマウスの低転移性結腸癌細胞に活性型 c-erbB-2 を導入することにより、その転移能が上昇することを報告している²⁰⁾。これは、c-erbB-2 が癌細胞の性状、特に悪性度に関係していることを示し、今回の結果を裏付けるものと考えられる。

今回の検討から、grade 2 症例においては PCNA および c-erbB-2 を測定することにより、予後不良と考えられる症例を選別し、これら症例に対して、術後補助療法として免疫療法、化学療法などの積極的治療法を選択することにより予後の改善が図られることを期待するものである。

結 語

腎細胞癌71例について核 DNA ploidy, AgNOR, PCNA, c-erbB-2 を測定した。腎細胞癌全体では核 DNA ploidy, AgNOR, PCNA, c-erbB-2 はいずれも予後予測因子として有用であることが示唆され、さらに grade 2 症例においても PCNA と c-erbB-2 は予後予測因子として有用であることが示唆された。

稿を終えるにあたり、検体提供に御協力頂いた岐阜大学医学部泌尿器科教室員諸兄、以下の各関連病院泌尿器科の諸先生方ならびに測定にご協力いただいたトヨタ記念病院検査科長坂彰悟、坂本敏則氏に深謝致します。

県立岐阜病院、松波総合病院、岐阜市民病院、長浜赤十字病院、彦根市立病院、岐阜赤十字病院、木沢記念病院、県立下呂温泉病院、博愛会総合病院

文 献

- 1) 大西智郎, 町田豊平, 増田富士男, ほか: Stage 1 の腎細胞癌症例の予後に及ぼす因子の解析. 日泌尿会誌 **84**: 757-762, 1993
- 2) McNichols DW, Segura JW and deWeerd JH: Renal cell carcinoma: Long-term survival and late recurrence. J Urol **126**: 853-863, 1988
- 3) 里見佳昭, 福田百邦, 穂坂正彦, ほか: 腎癌の予後に関する臨床統計. 日泌尿会誌 **79**: 853-863, 1988
- 4) 金丸洋史, 白波瀬敏明, 五十川義晃, ほか: 腎細胞癌の治療成績および予後因子の検討. 泌尿紀要 **40**: 5-8, 1994
- 5) 北村康男, 渡辺 学, 小松原秀一, ほか: 腎細胞癌288例の治療成績. 泌尿紀要 **42**: 11-16, 1996
- 6) Platon D, Menager M, Jeannesson P, et al.: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar

- organizer regions at the optical level. *Histochem J* **18**: 5-14, 1986
- 7) Brovo R, Frank R, Blundell PA, et al.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* **326**: 515-517, 1987
- 8) Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, et al.: Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* **319**: 230-234, 1986
- 9) 日本泌尿器科学会 日本病理学会・日本医学放射線学会編: 腎癌取り扱い規約. 第1版, 金原出版, 東京, 1993
- 10) Vindeløv LL, Christensen IJ and Nissen NI: A detergent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* **3**: 323-327, 1983
- 11) 中野清一, 川村壽一: 腎細胞癌における Proliferating cell nuclear antigen の発現と予後の関係—病理組織学的所見および核 DNA 量との比較—*泌尿紀要* **41**: 343-348, 1995
- 12) 永森 聡: Flowcytometry による腎細胞癌の heterogeneity の検討. *日泌尿会誌* **81**: 593-600, 1990
- 13) 阿部功一, 正井基之, 井坂茂夫, ほか: 腎細胞癌における核小体形成部位の検討. *日泌尿会誌* **84**: 642-649, 1993
- 14) Matthews B, Bernstein RM, Franza BR Jr, et al.: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* **309**: 374-376, 1984
- 15) 吉川裕泰, 池内隆夫, 井口 宏, ほか: 膀胱移行上皮癌における PCNA/cyclin, p53, C-erbB-2 の発現と組織学的悪性度に関する検討. *泌尿紀要* **41**: 253-258, 1995
- 16) 住吉義光, 井上善雄, 秋山昌範: 膀胱癌における Proliferating Cell Nuclear Antigen の免疫組織学的検討. *日泌尿会誌* **84**: 1643-1648, 1993
- 17) 大山 力, 伊藤明宏, 徳山 聡, ほか: 精巣腫瘍における Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) と Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (AgNOR) の臨床的意義. *日泌尿会誌* **86**: 1543-1551, 1995
- 18) 関 春夫, 永森 聡, 小柳知彦: 腎細胞癌における Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) の発現. *日泌尿会誌* **86**: 1475-1482, 1995
- 19) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al.: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**: 177-182, 1987
- 20) Yusa K, Sugimoto Y, Yamori T, et al.: Low metastatic potential of clone from murine colon adenocarcinoma 26 increased by transfection of activated c-erbB-2 gene. *J Natl Cancer Inst* **82**: 1633-1636, 1990

(Received on May 14, 1997)

(Accepted on August 18, 1997)

(迅速掲載)